CE

DuoFLEX Cocktail
Anti-CD3
Anti-CD20cy
Ready-to-Use
(Dako Autostainer/Autostainer Plus)

N.º de catálogo IK002

Uso previsto

Para uso en diagnóstico *in vitro*.

Las combinaciones de anticuerpos DuoFLEX Cocktail Polyclonal Rabbit Anti-Human CD3 y Monoclonal Mouse Anti-Human CD20cy, clon L26, (Dako Autostainer/Autostainer Plus), están indicadas para su uso en inmunohistoquímica junto con los instrumentos Dako Autostainer/Autostainer Plus. El anticuerpo Polyclonal Rabbit Anti-Human CD3 resulta útil en la identificación de las células T y neoplasias relacionadas (1,2). El anticuerpo Anti-Human CD20cy marca células del linaje de células B y resulta útil para la identificación de neoplasias derivadas de células B (3). La interpretación de los resultados de cualquier tinción o su ausencia debe complementarse con estudios morfológicos con controles adecuados y debe evaluarla un anatomopatólogo cualificado en el contexto de la historia clínica del paciente y de otras pruebas diagnósticas.

Sinónimos del antígeno

CD3:T3, complejo CD3 (4). CD20:L26 (5).

Resumen y explicación

CD3:

El CD3 consta de, por lo menos, cuatro componentes diferentes (γ,δ,ε,ζ) de 20–28 kDa. En la superficie celular de los linfocitos, el CD3 se asocia sin covalencia con el receptor de células T (TCR). Se cree que los componentes del CD3 del complejo TCR/CD3 intervienen en transducción de la señal sobre el reconocimiento del antígeno por la TCR (6).

Las células T expresan el CD3 en el timo, la médula ósea, el tejido linfoide periférico y la sangre (7,8). Se sabe que el único otro tipo de células normales marcadas por los anticuerpos contra CD3 son las células de Purkinje en el cerebelo (9). El antígeno CD3 se detecta primero en timocitos precoces y su aparición probablemente representa uno de los primeros signos de compromiso del linaje de células T (7) . En los timocitos inmaduros, la expresión de CD3 es exclusivamente citoplasmática; el CD3 asociado con la membrana aparece posteriormente, cuando madura la célula (7).

La mayoría de las neoplasias de células T expresan el antígeno CD3, mientras que éste se encuentra ausente de los tumores malignos linfoides de células no T (10). De acuerdo con el patrón de síntesis del antígeno en timocitos normales, el primer sitio donde se detecta el CD3 dentro de las células neoplásicas es el citoplasma celular (7). Se ha considerado que el CD3 es un marcador fundamental en la evaluación inicial de los trastornos linfoproliferativos crónicos (11). La leucemia de linfocitos granulares grandes de células T (T-LGL) se caracteriza por el inmunofenotipo CD3+/CD57+/CD56 y la reordenación clonal de los genes receptores de células T (12).

CD20:

CD20 es una proteína transmembrana no glucosilada que se expresa en los precursores de células B y en las células B maduras, pero se pierde tras la diferenciación en los plasmocitos (13). En las células B en reposo, CD20 aparece en una forma no fosforilada de 33 kDa. Tras la estimulación mitógena, CD20 se vuelve altamente fosforilada (isoformas de 35–37 kDa) y es una fosfoproteína dominante en las células B activadas, en las líneas celulares B y en las leucemias de células peludas (5). Los extremos largos N y C terminal de la proteína se ubican en el lado citoplásmico de la membrana y sólo una porción menor de la proteína está expuesta en la superficie de la célula (13). A los anticuerpos que reaccionan con los epítopos citoplásmicos CD20 se los denomina CD20cy (5). Se sugiere que CD20 participa directamente en la regulación del flujo conductivo transmembrana de Ca^{2+} de las células B, lo que indica la posible función de CD20 como regulador de la proliferación y la diferenciación (13).

Consulte las *Instrucciones generales para la tinción inmunohistoquímica* de Dako o las instrucciones del sistema de detección de los procedimientos de IHQ para: 1) Principio del procedimiento, 2) Material necesario pero no suministrado, 3) Almacenamiento, 4) Preparación de la muestra, 5) Procedimiento de tinción, 6) Control de calidad, 7) Solución de problemas, 8) Interpretación de la tinción, 9) Limitaciones generales.

Reactivo suministrado

Combinación de anticuerpo policlonal de conejo y monoclonal de ratón listos para usar suministrados en forma líquida en un tampón que contiene proteína estabilizadora y 0,015 mol/L de azida sódica.

Anticuerpo policlonal de conejo anti-humano CD3

Anticuerpo monoclonal de ratón anti-humano CD20cy, clon L26, Isotipo: IgG2a, kappa

Inmunógeno

CD3: péptido sintético compuesto por 156–168 aminoácidos de la parte citoplásmatica de la cadena ε del CD3 humano unido a la tiroglobulina (1).

CD20: células B de amígdala humana (14).

Especificidad

CD3:

En la transferencia de Western, el anticuerpo CD3 detecta bandas de los pesos moleculares esperados para los antígenos CD3 (2). El anticuerpo reconoce el CD3ε tanto en la línea celular T (Jurkat) como en una línea celular citolítica natural (NK11), pero no reacciona con lisados preparados de varias líneas de células B (Raji, Ramos y JY), con una línea celular mieloide (U937) o con una línea celular de carcinoma de colon (Colo-205) (15).

En la inmunoprecipitación de lisados Nonidet P40 de linfoblastos T con superficie yodada, el anticuerpo precipita las cadenas γ (26 kDa), δ (21 kDa) y ε (19 kDa) de la molécula de CD3, con un patrón de precipitación similar al observado con el anticuerpo monoclonal de ratón anti-humano CD3 bien caracterizado, clon UCHT1 (1).

En el ELISA, el anticuerpo marca el péptido CD3 utilizado como inmunógeno.

CD20:

El anti-CD20cy humano, clon L26, fue agrupado como anti-CD20 en el Fifth International Workshop and Conference on Human Leucocyte Differentiation Antigens (5.º Taller y Conferencia Internacional sobre Antígenos para la diferenciación leucocitaria humana) (5).

El análisis SDS-PAGE de inmunoprecipitados formados entre el lisado de células de amígdala marcadas con ^{125}I y el anticuerpo muestra una reacción principalmente con polipéptidos de 30 kDa y 33 kD (14).

Los estudios con células COS-1 transfectadas con ADNc que codifican la molécula CD20 indican que el anticuerpo marca el epítopo intracitoplásmico localizado en la molécula de CD20 (16).

Precauciones

1. Para usuarios profesionales.
2. Este producto contiene azida sódica (NaN_3), un compuesto químico altamente tóxico en su forma pura. Aunque no está clasificada como peligrosa, a la concentración en la que se encuentra en el producto, la azida sódica puede reaccionar con el cobre o el plomo de las cañerías para formar compuestos de azidas metálicas altamente explosivas. Una vez desechado, deje correr abundante cantidad de agua para evitar acumulaciones de azidas metálicas en las cañerías.
3. Al igual que con cualquier producto derivado de fuentes biológicas, deberán aplicarse procedimientos adecuados de manejo.
4. Utilice el equipo de protección personal adecuado para evitar el contacto con los ojos y la piel.
5. La solución que no se utilice deberá desecharse de acuerdo con las normativas locales, provinciales y nacionales.

Almacenamiento

Almacenar a 2–8 ℃. No utilizar después de la fecha de caducidad impresa en el vial. Si los reactivos se almacenan bajo condiciones diferentes a las especificadas, dichas condiciones deben ser verificadas por el usuario. No existen signos evidentes que indiquen la inestabilidad de este producto. Por lo tanto, los controles positivo y negativo deberán realizarse de manera simultánea con las muestras del paciente. Si observa una tinción inesperada que no puede explicarse por variaciones en los procedimientos del laboratorio y sospecha de la existencia de un problema con el anticuerpo, póngase en contacto el servicio técnico de Dako.

Preparación de las muestras incluido el material necesario pero no suministrado

La combinación de anticuerpos puede utilizarse para marcar cortes de tejido fijados con formol e incluidos en parafina. Las muestras de tejido deben cortarse en secciones de aproximadamente 4 µm.

Se requiere un tratamiento previo con recuperación del epítopo inducida por calor (HIER, por sus siglas en inglés). Se obtienen resultados óptimos al pretratar los tejidos con EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (n.º de catálogo K8004).

Cortes desparafinados: se recomienda el tratamiento previo de los cortes de tejido desparafinados, fijados en formol e incluidos en parafina usando Dako PT Link (n.º de catálogo PT100/PT101). Para más detalles, consulte la Guía del usuario de PT Link.

Siga el procedimiento de tratamiento previo explicado en el prospecto de la EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (n.º de catálogo K8004). Se deben aplicar los siguientes parámetros para PT Link: temperatura de precalentamiento: 65 ℃; temperatura y tiempo de recuperación del epítopo: 97 ℃ durante 20 (±1) minutos; enfriar a 65 ℃. Extraiga la gradilla para portaobjetos Autostainer con los portaobjetos del tanque PT Link e introduzca los portaobjetos inmediatamente en un bote o tanque (p.ej., PT Link Rinse Station, código PT109) con EnVision™ FLEX Wash Buffer (20x), (Link) (n.º de catálogo K8007) diluido y a temperatura ambiente. Deje los portaobjetos en Wash Buffer durante 1-5 minutos.

Cortes incluidos en parafina: el método preferido para la colocación de cubreobjetos consiste en la utilización del medio de montaje acuoso (Dako Faramount n.º de catálogo S3025). Como método alternativo de preparación de una muestra, tanto el desparafinado como la recuperación del epítopo se pueden realizar en el PT Link con un procedimiento modificado. Consulte las instrucciones en la Guía del usuario de PT Link. Después de finalizar el procedimiento de tinción, se deben secar al aire a 60 ℃ durante una hora, sumergir en xileno y montar los cortes usando un medio de montaje permanente. Debe evitarse el uso de alcohol con los medios de montaje permanente, dado que puede reducir la reactividad de la solución de cromógeno rojo.

Antes de realizar el montaje, los cortes de tejido no se deben secar durante el tratamiento previo ni durante el siguiente procedimiento de tinción inmunohistoquímica. Para una mejor adherencia de los cortes de tejidos a los portaobjetos, se recomienda el uso de Dako FLEX IHC Microscope Slides (n.º de catálogo K8020).

Procedimiento de tinción incluido el material necesario pero no suministrado

El sistema de visualización recomendado es EnVision™ DuoFLEX Doublestain System, (Link) (n.º de catálogo K6807). Los pasos de tinción y los tiempos de incubación han sido preprogramados en el software de los instrumentos Dako Autostainer/Autostainer Plus usando los siguientes protocolos.

Plantilla del protocolo: DuoFLEX2 (volumen de aplicación 200 µL) o DuoFLEX3 (volumen de aplicación 300 µL)

Autoprograma: CD3CD20 (sin contratinción) o CD3CD20H (con contratinción)

Todos los pasos de incubación deben realizarse a temperatura ambiente. Consulte el Manual del usuario para más detalles sobre el instrumento correspondiente. Si todavía no están disponibles los protocolos en el instrumento Dako Autostainer utilizado, comuníquese con el servicio técnico de Dako.

Las condiciones óptimas pueden variar según la muestra y el método de preparación. Por lo tanto, deberán determinarse individualmente en cada laboratorio. Si el patólogo encargado de la evaluación desea otra intensidad de tinción, se puede solicitar información a un especialista en aplicaciones de Dako o a un especialista del servicio técnico para reprogramar el protocolo. Verifique que el rendimiento del protocolo ajustado siga siendo válido confirmando que el patrón de tinción sea idéntico al descrito en “Características de resultados”.

Se recomienda la contratinción en hematoxilina usando EnVision™ FLEX Hematoxylin, (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (n.º de catálogo K8018). Después de finalizado el procedimiento de tinción, se deben secar al aire, sumergir en xileno y montar los cortes usando un medio de montaje permanente. Debe evitarse el uso de alcohol con los medios de montaje permanente, dado que puede reducir la reactividad de la solución de cromógeno rojo.

Los controles positivo y negativo deberán realizarse de manera simultánea empleando el mismo protocolo que para las muestras del paciente. El tejido de control positivo debe incluir la amígdala. Asimismo, las células y estructuras deben mostrar patrones de reacción como se describe para este tejido en "Características de resultados" en todas las muestras positivas.

Interpretación de la tinción

CD3: las células marcadas por el anticuerpo CD3 muestran tinción citoplasmática roja o de la membrana.

CD20: las células B marcadas por el anticuerpo CD20 muestran tinción marrón del lado citoplasmático de la superficie de la membrana celular.

Características de resultados

Tejidos normales:

CD3:

El anticuerpo CD3 marca las células T de diversos tejidos, incluidos la amígdala y el colon. Las células T en las áreas interfoliculares de la amígdala muestran una reacción de tinción de moderada a fuerte, mientras que las células T en los centros germinales de amígdala y en el epitelio del colon muestran una reacción de tinción de color rojo de leve a moderada.

CD20:

El anticuerpo CD20, en el tejido linfoideo normal, marca el centro de las células germinales, los linfocitos de la zona del manto y los linfocitos interfoliculares dispersos, pero no las células T, los histiocitos y los plasmocitos (17, 18). No se observó marcado en epidermis, glándulas sebáceas, folículos pilosos y glándulas ecrinas de la piel, epitelio folicular en la tiroides, neumocitos y epitelio bronquial pulmonar y una gran cantidad de otros tejidos no linfoides normales analizados (17). Las células B del centro germinal y de la zona del manto en amígdala muestran una reacción a la tinción de moderada a fuerte, mientras que las células B aisladas del hígado tienen una reacción de tinción marrón de débil a moderada.

Tejidos anormales:

CD3:

El anticuerpo marcó 73/96 neoplasias de células T, incluidas 7/9 linfoblásticas, 25/35 pleomórficas, 5/5 inmunoblásticas, 5/5 angioinmunoblásticas del tipo linfoadenopático, 2/2 linfomas de zona T, 19/19 micosis fungoides/síndromes de Sézary, 2/3 linfomas de Lennert, 4/13 linfomas anaplásicos de células grandes Ki-1 positivos, 3/4 papulosis linfomatoides, 1/1 linfoma asociado con enfermedad celíaca (1). El anticuerpo marcó 149/149 casos de leucemias/linfomas linfoblásticos agudos (ALL) de células T (precursoras). En 131/149 casos, el 100% de las células fueron positivas; en 14 casos entre el 50 y el 90% de las células fueron positivas y en 4 casos menos del 50% de las células fueron positivas. No se observó ningún marcado en 68/68 casos de ALL de células B (precursoras), aparte de las células T infiltrantes reactivas (2).

CD20:

el antígeno CD20 se marcó en la mayor parte de las 131 neoplasias de células B analizadas (3). El marcado con el anticuerpo mostró que en la diferenciación de las células B, el antígeno CD20 no se expresó en células linfoides muy inmaduras (0/6 leucemias no diferenciadas agudas), sino que comenzó a expresarse en los estadios madurativos tempranos (14/34 leucemias linfoblásticas agudas comunes y 7/9 leucemias linfoblásticas agudas pre-B). Además, el antígeno CD20 se expresó plenamente en las células B maduras (15/15 leucemias linfocíticas crónicas, 3/3 prolinfocíticas, 3/3 de células peludas, 6/7 de células linfosarcomatosas, y 45/46 linfomas malignos de células B, incluidos los linfomas de Burkitt, de Waldenström e inmunoblásticos de células B). El antígeno CD20 desaparece en los plasmocitos y el anticuerpo sólo marcó 1/2 leucemias de plasmocitos y 0/12 mielomas (3). Otros estudios brindaron resultados similares que muestran una tinción positiva en 44/44 linfomas de células B inmunoblásticos y de células grandes (17) y de los 40 linfomas de células B, con la excepción de las leucemias linfoblásticas agudas comunes y del linfoma plasmacítico maligno. En la enfermedad de Hodgkin, en 9/27 casos se observó una fuerte tinción de la membrana de superficie de las células Reed-Sternberg (18). De las enfermedades linfoproliferativas de linaje de células T, el anticuerpo marcó 0/73 (3), mientras que otros estudios mostraron 1/18 (18) y 1/111 (19) casos positivos. Se han informado casos inusuales de linfomas periféricos de células T positivos para CD20 (18,19).

Referencias bibliográficas

1. Mason DY, Cordell J, Brown M, Pallesen G, Ralfkiaer E, Rothbard J, et al. Detection of cells in paraffin wax embedded tissue, using antibodies against a peptide sequence from the CD3 antigen. J Clin Pathol 1989; 42:1194-1200.
2. Pilozzi E, Pulford K, Jones M, Müller-Hermelink H-K, Falini B, Ralfkiaer E, et al. Co-expression of CD79a (JCB117) and CD3 by lymphoblastic lymphoma. J Pathol 1988; 186:140-3.
3. Takami T, Qi C-F, Yamada T, Yamashina M, Kon S-I, Ishii Y, et al. B20.3. Reactivity and specificity of L26 (pan-B cell mAb) on 322 cases of fresh and paraffin-embedded lymphoproliferative diseases. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, Rieber EP, Schmidt RE, Stein H, et al., editors. Leukocyte typing IV. White cell differentiation antigens. Proceedings of the 4th International Workshop and Conference; 1989 Feb 21-25; Vienna, Austria. Oxford, New York, Tokyo: Oxford University Press; 1989. p. 134-6.
4. CD guide In: Kishimoto T, Kikutani H, von dem Borne AEG, Goyert SM, Mason DY, Miyasaka M, et al., editors. Leucocyte typing VI. White cell differentiation antigens. Proceedings of the 6th International Workshop and Conference; 1996 Nov 10-14; Kobe, Japan. New York, London: Garland Publishing Inc.; 1997. p. 1111.
5. Zhou L-J, Tedder TF. CD20 workshop panel report. In: Schlossman SF, Boumsell L, Gilks W, Harlan JM, Kishimoto T, Morimoto C, et al., editors. Leukocyte typing V. White cell differentiation antigens. Proceedings of the 5th International Workshop and Conference; 1993 Nov 3-7; Boston, USA. Oxford, New York, Tokyo: Oxford University Press; 1995. p. 511-4.
6. Jacobs H. Pre-TCR/CD3 and TCR/CD3 complexes: decamers with differential signalling properties? Immunol Today 1997; 18:565-9.
7. Campana D, Thompson JS, Amlot P, Brown S, Janossy G. The cytoplasmic expression of CD3 antigens in normal and malignant cells of the T lymphoid lineage. J Immunol 1987; 138:648-55.
8. Tunnacliffe HA, Olsson C, Traunecker A, Krissansen GW, Karjalainen K, De la Hera A. The majority of CD3 epitopes are conferred by the epsilon chain. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR, Rieber EP, Schmidt RE, Stein H, et al., editors. Leukocyte typing IV. White cell differentiation antigens. Proceedings of the 4th International Workshop and Conference; 1989 Feb 21-25; Vienna, Austria. Oxford, New York, Tokyo: Oxford University Press; 1989. p. 295-6.
9. Garson JA, Beverley PC, Coakham HB, Harper EI. Monoclonal antibodies against human T lymphocytes label Purkinje neurones of many species. Nature 1982; 298:375-7.
10. Erber WN, Mynheer LC, Mason DY. APAAP labeling of blood and bone-marrow samples for phenotyping leukaemia. Lancet 1986;i: 761-5.
11. Braylan RC, Orfao A, Borowitz MJ, Davis BH. Optimal number of reagents required to evaluate hematolymphoid neoplasias: results of an international consensus meeting. Cytometry 2001; 46:23-7.
12. Kingreen D, Siegert W. Chronic lymphatic leukemias of T and NK cell type. Leukemia 1997; 11 Suppl 2:S46-9.
13. Tedder TF, Engel P. CD20: a regulator of cell-cycle progression of B-lymphocytes. Immunology Today 1994; 15:450-4.
14. Ishii Y, Takami T, Yuasa H, Takei T, Kikuchi K. Two distinct antigen systems in human B-lymphocytes: identification of cell surface and intracellular antigens using monoclonal antibodies. Clin Exp Immunol 1984; 58:183-92.
15. Lanier LL, Chang C, Spitz H, Pillips JH. Expression of cytoplasmic CD3ε proteins in activated human adult natural killer (NK) cells and CD3γ, δ, ε complexes in fetal NK cells. Implications for the relationship of NK and T lymphocytes. J Immunol 1992; 149:1876-80.
16. Mason DY, Comans-Bitter WM, Cordell JL, Verhoeven MAJ, van Dongen JJM. Antibody L26 recognizes an intracellular epitope on the B cell-associated CD20 antigen. Am J Pathol 1990;136:1215-22.
17. Cartun RW, Coles FB, Pastuszak WT. Utilization of monoclonal antibody L26 in the identification and confirmation of B cell lymphomas. A sensitive and specific marker applicable to formalin- and B5-fixed, paraffin-embedded tissues. Am J Pathol 1987;129:415-21.
18. Norton AJ, Isaacson PG. Monoclonal antibody L26: an antibody that is reactive with normal and neoplastic B lymphocytes in routinely fixed and paraffin wax embedded tissue. J Clin Pathol 1987; 40:1405-12.
19. Blakolmer K, Vesely M, Kummer JA, Jurecka W, Mannhalter C, Chott A. Immunoreactivity of B cell markers (CD79a, L26) in rare cases of extranodal cytotoxic peripheral T- (NK/T-) cell lymphomas. Mod Pathol 2000; 13:766-72.

REF Número de catálogo	Limite de temperatura	Consulte las instrucciones de uso
Fabricante	LOT Código de lote	Fecha de caducidad
EC REP Representante autorizado en la Comunidad Europea		IVD Producto sanitario para diagnóstico in vitro

PT0039/Rev C

Dako North America, Inc.
6392 Via Real
Carpinteria, California 93013 USA

Tel 805 566 6655
Fax 805 566 6688
Technical Support 800 424 0021
Customer Service 800 235 5763

EC REP
Dako Denmark A/S
Produktionsvej 42
DK-2600 Glostrup Denmark

Tel +45 4485 9500
Fax +45 4485 9595

www.dako.com

Edición 03/09